

SZÁMÍTÓGÉPPEL VEZÉRELT AMINOSAVANALIZÁTOR ELVÁLASZTÁSI PARAMÉTEREINEK OPTIMALIZÁLÁSA

Török Attiláné dr.^M - Varró Györgyné^M

Bevezetés

Az aminosav-analitika hatalmas fejlődésen ment keresztül, különösen, amióta Spackman, Stein és Moore (1958) az ioncserélő gyantán történő oszlopkromatográfias elválasztási eljárásukat közzétették. Különösen nagy jelentőségű volt a szférikus ioncserélő gyanták (Hamilton, 1963) és a gradiens elució technika (Piez, Morris, 1967) alkalmazása. A további törekvések főleg a módszer automatizálására és sorozatvizsgálatokra való alkalmassá tételére irányultak (Murren, 1979). Hazai viszonylatban Dévényi (1969) végzett kiemelkedő munkát e téren. A műszeres aminosav-analitika napjainkban is újabb és újabb eredményekkel segíti elő a kutatókat a felmerülő igények (pl. minél kisebb vizsgálandó mintamennyiség, rövidebb analízis idő) kielégítésére, valamint a nagy műszergyártó cégek konkurenciája következtében.

Az aminosav-analitika elméleti alapjairól és metodikai eljárásairól Kerese (1975) ad részletes áttekintést.

Az 1970-es évek során két hazai gyár, a Labor MIM és a Chinoín hoztak forgalomba aminosav-analizátort, amelyek az aminosavösszetétel meghatározások iránt támasztott igényeket kellően kielégítették.

Intézményünk Központi Laboratóriumában egy Chinoín Lyz-75 típusú aminosav analizátor működött 1974-től, amely mind a klasszikus Moore-Stein szerinti kétoszlopos eljárással, mind pedig a Dévényi-féle oszlopos, hárompufferes elválasztási eljárással üzemeltethető volt.

^MKÉÉ Élelmiszeripari Főiskolai Kar, Központi Laboratóriuma

A készülék lényegében manuális működtetésű volt, bár a pufferváltást egy óramű segítségével automatizálni lehetett. Viszonylag nagy mintatérfogatot ($0,5\text{ cm}^3$) hidrolizátum) és analízisidőt (4 óra) igényelt, és a nagymennyiségű eluálód puffersizükséglet miatt sűrűn kellett új reagenseket, ezzel együtt új aminosavstandard analízist készíteni.

A műszerrel végezhető elválasztás azonban mind a pontosságot, reprodukálhatóságot, mind pedig a meghatározások száma által támasztott igényeket eleinte kielégítette.

A Főiskolán folyó kutatási témák azonban egyre nagyobb számban igényelték az aminosavanalíziseket, alapvetően az előbbi területeken:

- élelmiszerek összetételének korszerűsítése,
- dúsító, komplementáló adalékok hatásának vizsgálata,
- az összfehérjetartalomon belül a táplálkozástanilag kevésbé értékes fehérjék jelenlétének detektálása,
- technológiai folyamatok (pl. hőkezelés, besugárzás, stb.) hatásainak nyomonkövetése,
- ipari hulladékfehérjék hasznosítási lehetőségeinek vizsgálata,
- stb.

Ezzel egyidejűleg a műszer lassú műszaki elavulása ment végbe. Mindez szükségessé tette, hogy megkeressük a lehetőségét a nagyobb mintaszámú analízisek elvégzésének.

Mivel az eredeti gyártó cég (Chinoin) a hazai igények kielégítése után előbb a gyártást, majd a szervizét is beszüntette, új aminosav-analizátor beszerzésére pedig nem volt keretünk, egyedi megoldás mellett döntöttünk.

A Labotech PJT az eredeti Chinoin-műszer felújítása, modernizálása és számítógépes vezérlőegységgel való ellátása révén egy nagyteljesítményű aminosav-analizátort helyezett üzembe. A műszaki és elektronikus beüzemelés után az elválasztás kémiai paramétereinek optimalizálását és reprodukálhatósági vizsgálatokat végeztük el.

A továbbiakban ismertetjük a műszer felépítését, az eddigiektől eltérő részek funkcióját, az általunk optimálisnak talált kémiai elválasztási körülményeket és programtervet.

A fejlesztőmunka jelenleg is folyamatban van, mégpedig a műszer által kinyomtatott kromatogramok értékelőprogramjának pontosítása, ezáltal az értékelés gyorsabbá és automatikussá tétele területén.

Az aminosav-analizátor felépítése és funkciói

A felújított aminosav-analizátor alapvetően két fő részből áll:

- elválasztó egység,
- vezérlőegység.

Az elválasztóegység leglényegesebb része az ioncserélő oszlop, amely az ioncserélő gyantátöltetet tartalmazza. Belső átmérője 0,4 cm, hossza 40 cm, amelyben 20-22 cm magasságú gyantaszlop van elhelyezve. A megfelelő hőmérsékletet vízfűrdőköpeny biztosítja. Az oszlop felső része a mintafelvitelt szolgáló hurokrendszerrel, illetve a pufferszivattyúk vezetékével van kapcsolatban. Az eluáló puffer a tartályokból pufferszivattyú révén, nagy nyomással (amelyet a manométer mutat) jut az oszlopra. Az oszlopon áthaladva a reagenstartályból szivattyú által folyamatosan áramoltatott ninhidrin-oldattal keveredik az elválasztott aminosavakat tartalmazó eluátum. Innen a szabályozott hőmérsékletű reakcióedénybe kerül

az oldat, ahol az aminosavak mennyiségével arányos intenzitású színreakció alakul ki. A különböző mértékben elszíneződött oldat áthalad egy átfolyó-küvettás fotométeren, amely 520 nm-nél méri a fényelnyelés mértékét, amelyet a vezérlő egységbe juttat.

Az elválasztó egység tehát lényegében az egyoszlopos, hárompufferes eljárás elvén működik.

A vezérlőegység feladata az analízis végrehajtásához szükséges pufferváltások és hőmérsékletváltások megfelelő időpontjának biztosítása; a betáplált paraméterek kívánt értékeken való tartása; a fotométerről jövő transzmissziós jel lineáris értékkel való átalakítása és kirajzolása a képernyőre, végül a printerre. A vezérlőegység által végrehajtandó programot magnokazettáról tápláljuk be a számítógépbe.

Az elválasztás menetét a képernyőre folyamatosan kirajzolt kromatogram egyidejűleg mutatja. Az elválasztás végén a kromatogramot a printer automatikusan kinyomtatja.

Az aminosav-analízis optimális paraméterei

Az elválasztás körülményeinek lépésről-lépésre történő változtatása; valamint glutaminsav-hígítási sorozattal végzett reprodukálhatósági vizsgálatok alapján az alábbi paraméter értékeket tartjuk optimálisnak élelmiszerfehérje hidrolizátumok aminosavtartalmának minőségi és mennyiségi meghatározása céljára:

Gyantatöltet: Varion-chrom 9 (Labor MIM)

Osztóptöltet: 4,5 x 230 mm

Az oszlopra felvitt hidrolizátum térfogat: 30 μ l

Bemosó pufferoldat: pH = 2,2

**Eluáló pufferek: PICO pufferkészlet koncentrátumaiból
hígítással készítve**

Eluáló pufferek:	kémhatás	oszlophőmérséklet	nyomás
<u>A</u> puffer	pH=3,05	40-65 °C	55 bar
<u>B</u> puffer	pH=3,60	65 °C	45 bar
<u>C</u> puffer	pH=4,15	80 °C	35 bar

Áramlási sebesség: puffer 180 sec/cm³
Fotométer: 520 nm reagens 120 sec/cm³

Regenerálás: 0,2 n NaOH oldattal, 20 percig

Indítási paraméterek: termosztát 65 °C
coil 95 °C

Analízis paraméterek: programvezérlés szerint
coil 95 °C

Teljes analízis idő: 78 perc

Érzékenységi konstans: 10.

Automatikus üzemmódra kidolgozott, optimális elválasztást eredményező programtervet táblázatban összeállítva adjuk meg (I. táblázat). A + jelek a fényceruzával a monitorra vitt utasításokat jelentenek, vagyis, hogy egy adott fázisban milyen paraméter értékek, és melyik műszeregységek funkcionálnak. (Pl. a melléklet táblázat 4. fázisában 10 percig 65 °C-on áramlik a C ouffer és R reagens, miközben az F fotométert és az I integrátort is üzemel.)

A számítógéppel vezérelt aminosavanalizátor értékelése

- Az ismertetett rendszer egyetlen, kis átmérőjű, kis magasságú elválasztó oszloppal működik, amely lehetővé teszi a szükséges mintatérfogot, és átáramló oldatok térfogatának csökkentését, ugyanakkor az elválasztás szelektivitásának növelését.

I. táblázat
PROGRAM TERV

Fázis	Idő (perc)	Hőmérséklet °C	A (pufferek)	B	C	L (lúg)	R (Reagens)	F (fotométer)	I (integr.)	P (printer)	M (minta)
I1											
I2	21	40	+				+	+			
1	10	40	+				+	+			+
2	6	65	+				+	+	+		
3	13	65		+			+	+	+		
4	10	65			+		+	+	+		
5	12	80			+		+	+	+		
6	5	80				+	+	+	+		
7	6	80	+				+	+	+		
8	11	40	+				+	+	+		
9	4	40	+				+	+	+	+	
10											

- Velemennyi puffer- és eluens-vezeték kis átmérőjű, amely szintén hozzájárul a kis vegyszerfelhasználáshoz, és az elválasztás javulásához.
- A pufferoldatok megnövelt nyomáson való átáramoltatása csökkentti az analízis-időtartamát.
- A szükséges mintatérfogat igen kicsi (30 μ l).
- A mintafelvétel egyszerű és igen pontos.
- Az elválasztás kémiai paramétereinek értékei a minta jellegének, és az analízis igényeinek megfelelően változtathatók.
- Az analízis teljesen automatizálható.
- Az analízis idő 4 órától 70 percre csökkent.
- A kezelőnek a monitoron kijelzett kép alapján folyamatos és egyidejű ellenőrzési lehetősége van.
- A szükséges oldatok egyszerűen elkészíthetők, és hosszú ideig stabilisak, így a kis vegyszerigény következtében ritkábban kell újrakészíteni és standard analízissel ellenőrizni azokat.
- További feladat: különböző élelmiszerfélések (nyersanyagok és késztermékek) bevonása a vizsgálatokba, valamint az értékelő program további illesztése, és ellenőrzése.

IRODALOM

- Dáványi, T. (1969): Modified Single-column Procedure for the Automatic Analysis of Amino Acids
Acta Biochim. Biophys., Acad. Sci. Hung. 4, 297.
- Hamilton, P. (1963): Ion exchange chromatography of amino acids. A single column high resolving fully automatic procedure
Analyt. Chem. 35, 2055.

Kerese, I. (1975): A single column gradient elution ion exchange amino acid analyser. In: The analysis of biological materials (Ed.: Butter, L.R.P.) P.: 57 Pergamon Press, New York.

Piez, K., Morris, L. (1967): A modified procedure for the automated analysis of amino acids
Analyt. Biochem. 11, 15.

Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore, S. (1958): Automated recording apparatus for use in the chromatography of amino acids.
Analyt. Chem. 30. 1190.

OPTIMIZATION OF SEPARATION PARAMETERS OF A COMPUTER- -CONTROLLED AMINOACID ANALYSER

Török and Varró

The development of instruments for aminoacid analysis is reviewed. An account is given of the conditions necessitating the modernization of the previously used Chinoir Lyz 75 instrument. The structure of the renewed instrument, with its computer-control unit, is presented, together with the functions of the new units. The parameters resulting in optimum separation and the computer-control software are given. The advantages of the improved instrument are assessed, and the experience to date is reported.

OPTIMALISIERUNG DER SEPARATIONSPARAMETER EINES COMPUTER- GESTEUERTEN AMINOSÄUREANALYSATORS

Frau A.Török - Frau Gy.Varró

Die Studie bietet einen Überblick über die in unseren Tagen statthabende Entwicklung unserer aminosäureanalytischen Geräte. Sie schildert die Umstände, welche die Notwendigkeit einer Modernisierung der von den Verfassern bislang benutzten Einrichtung "Chinoin Lyz 75" hervorriefen. Vorgestellt werden der Aufbau des erneuten und mit einer Computer-Steureinheit versehenen Gerätes, sowie die Funktionen der neuen Einheiten. Angegeben sind die von den Autoren erarbeiteten - eine optimale Trennung gewährleistenden - Parameter und der für die Computersteuerung aufgestellte Programmplan.

Eine Bewertung der Vorteile des so entwickelten Gerätes und Erörterung der bisherigen Erfahrungen folgen.

ОПТИМИЗАЦИЯ РАЗДЕЛИТЕЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ АМИНО- КИСЛОТНОГО АНАЛИЗАТОРА, УПРАВЛЯЕМОГО ВЫЧИСЛИ- ТЕЛЬНОЙ МАШИНОЙ

Тёрёк Аттиланэ — Варро Дьёрдьнэ

Авторы работы даёт обзор происходящего в наши дни совершенствования приборов по аминокислотной аналитике. Они указывают обстоятельства, вызвавшие необходимость модернизации использованного ими прибора типа *Chinoln Lys 75*.

Авторы демонстрируют устройство прибора, снабжённого узлом управления вычислительной машиной, и функции его новых узлов. Далее даются разработанные ими наиболее оптимальные параметры разделения, а также план программы, составленной для управления с помощью вычислительной машины.

В работе излагаются преимущества усовершенствованного прибора и опыт его использования.